

二十五味肺病丸质量标准的研究

李翔¹, 刘亚丽², 乔培¹, 张婧^{1*}, 刘志青¹, 黄琴¹, 陈静³, 詹春风¹

(1. 江西中医药大学, 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西南昌 330004; 2. 江西中医药大学科技学院, 江西南昌 330004; 3. 南昌大学第一临床医学院, 江西南昌 330000)

摘要: 目的 建立藏药二十五味肺病丸(藏木香、獐牙菜、余甘子、毛诃子等)质量标准。方法 TLC法定性鉴别藏木香、獐牙菜、余甘子、毛诃子, HPLC法定量测定土木香内酯、齐墩果酸、甘草酸、羟基红花黄色素A。结果 TLC斑点清晰, 阴性无干扰。土木香内酯、齐墩果酸、没食子酸、羟基红花黄色素A分别在4.324~216.2 μg/mL ($r=0.9999$)、32.222~1611.1 μg/mL ($r=0.9999$)、4.072~203.6 μg/mL ($r=0.9999$)、4.266~213.3 μg/mL ($r=0.9999$)范围内线性关系良好, 平均加样回收率(RSD)分别为100.6% (0.93%)、100.3% (2.1%)、101.5% (3.0%)、100.1% (1.8%)。结论 该方法简便快速, 可用于二十五味肺病丸的质量控制。

关键词: 二十五味肺病丸; 化学成分; TLC; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)07-1410-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.018

Quality standard for Ershiwuwei Feibing Pills

LI Xiang¹, LIU Ya-li², QIAO Pei¹, ZHANG Jing^{1*}, LIU Zhi-qing¹, HUANG Qin¹,
CHEN Jing³, ZHAN Chun-feng¹

(1. State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Ministry of Education Key Laboratory for Modern TCM Preparations, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Science and Technology College of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. The First Clinical Medical College, Nanchang University, Nanchang 330000, China)

ABSTRACT: AIM To establish the quality standard for Tibetan medicine Ershiwuwei Feibing Pills [*Inula racemosa* Hook. f., *Swertia bimaculata* (Sieb. et Zucc.) Hook. Thoms. ex Clarke, *Phyllanthus emblica* Linn., *Terminalia billerica* (Gaertn.) Roxb., etc.]. **METHODS** TLC was applied to the qualitative identification of *I. racemosa*, *S. bimaculata*, *P. emblica* and *T. billerica*, and HPLC was adopted in the quantitative determination of alantolactone, oleanolic acid, gallic acid and hydroxysafflor yellow A. **RESULTS** The TLC spots were clear without negative interference. Alantolactone, oleanolic acid, gallic acid and hydroxysafflor yellow A showed good linear relationships within the ranges of 4.324 – 216.2 μg/mL ($r=0.9999$), 32.222 – 1611.1 μg/mL ($r=0.9999$), 4.072 – 203.6 μg/mL ($r=0.9999$) and 4.266 – 213.3 μg/mL ($r=0.9999$), whose average recoveries (RSDs) were 100.6% (0.93%), 100.3% (2.1%), 101.5% (3.0%) and 100.1% (1.8%), respectively. **CONCLUSION** This simple method can be used for the rapid quality control of Ershiwuwei Feibing Pills.

KEY WORDS: Ershiwuwei Feibing Pills; chemical constituents; TLC; HPLC

收稿日期: 2017-02-04

基金项目: 国家自然科学基金(81603054, 81560575); 江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心开放基金项目资助项目(JXXT201403013); 江西省自然科学基金(20151BAB215040, 20151BAB215038); “赣鄱英才555工程”项目(赣财教指[2013]296); 江西省博士后科研择优资助项目(2016KY08); 2016年度省杰出青年人才资助计划(20162BCB23034)

作者简介: 李翔(1981—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791) 87119650, E-mail: sterlinghawk@126.com

* **通信作者:** 张婧(1983—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: (0791) 87119011, E-mail: evens_zhang@163.com

二十五味肺病丸始载于《四部医典》(全称甘露精要八支秘诀窍续),是依据传统藏医药理论,结合现代制药工艺研制而成的治疗肺部疾病的新藏药,由檀香、悬钩木、石灰华、红花、獐牙菜、沙棘膏、诃子、沙棘膏等25味药材组成,主要用于外邪引起的咳痰不止、呼吸急促、肺热、肺结核等,对陈旧性肺结核、慢性肺炎、肺气肿、间质性肺炎等热性肺病的疗效明显^[1]。

针对二十五味肺病丸的质量标准,在卫生部药品标准藏药第一册中仅采用TLC法对甘草进行了定性检测^[2];杜连平等^[3]定性检测了土木香、獐牙菜、甘草、诃子等七味药材,但仅建立了甘草酸的HPLC定量测定方法。为了进一步保证二十五味肺病丸质量、临床疗效及安全性,并实现生产和检测规范化,本实验补充了藏木香、獐牙菜、余甘子、毛诃子4种药材的定性检测,并建立HPLC法同时测定土木香内酯、齐墩果酸、甘草酸、羟基红花黄色素A含量,以期为其现代新型制剂的开发及质量评价提供技术支持。

1 材料

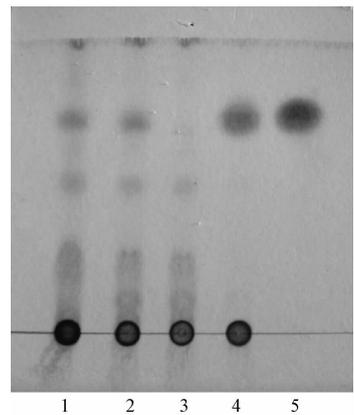
ZF-I型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂);70-1远红外快速干燥器(上海阳光实验仪器有限公司);JK-5200超声波清洗器(合肥金尼克机械制造有限公司);硅胶GF254薄层板(青岛海洋化工有限公司);BS124S电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);HJ-4A多头磁力搅拌器(科析仪器有限公司);Waters e2965高效液相色谱仪(美国沃特世公司)。

二十五味肺病丸购于西藏雄巴拉曲神水藏药厂(批号2014110102)。宽筋藤、藏木香、石灰华、巴夏嘎(拉萨)、榜嘎购于成都市金牛区荷花池中药材专业批发市场智诚中药材行;诃子、毛诃子、余甘子购于同地百奇药材行;短穗兔耳草、肉果草、无茎芥、力嘎都购于扬扬中药行;檀香、悬钩木、山柰、红花、葡萄、獐牙菜、甘草、沙棘膏、香早芹、白花龙胆花、甘肃蚤缀、铁棒锤(根、叶)、牛黄购于甘南佛阁藏药有限公司,均经江西中医药大学钟国跃教授鉴定为正品。以上25味药材经干燥、粉碎后,过80目筛,细粉混合均匀(按处方比例配制^[2])。羟基红花黄色素A(111637-201406)、土木香内酯(110760-201002)、齐墩果酸(110709-201206)、没食子酸(110834-201204)对照品由中国食品药品检定研究院提供。甲醇为色谱纯;其他试剂为分析纯;水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 TLC定性鉴定^[3]

2.1.1 藏木香 将5颗药丸(每颗约为0.5g)碾碎成粉末,精密称取2.5g置于量瓶中,加10mL甲醇超声30min,0.22μm微孔滤膜过滤,即得药丸供试品溶液;按处方精密称取各药材粉末2.5g,除藏木香外各药材粉末2.5g、藏木香粉末0.88g置于量瓶中,同法制备全药材、阴性对照、藏木香对照品溶液;精密称取土木香内酯对照品8.0mg,加1mL甲醇溶解,即得土木香内酯对照品溶液。以甲苯-石油醚-乙酸乙酯(1:5:1.5)为展开剂,避光展开后于硫酸乙醇中浸润,干燥后观察,结果见图1。由图可知,四者在相同位置上均出现明显清晰的蓝色斑点,阴性无干扰。



1. 药丸 2. 全药材 3. 阴性对照 4. 藏木香 5. 土木香内酯

1. pills 2. whole medicinal materials 3. negative control

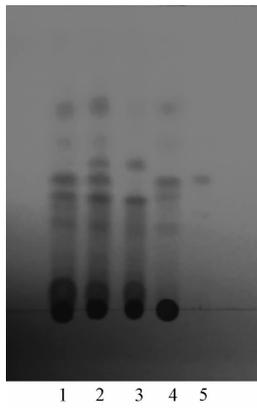
4. *I. racemosa* 5. alantolactone

图1 藏木香TLC色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of *I. racemosa*

2.1.2 獐牙菜 按“2.1.1”项下方法制备药丸供试品溶液;称取獐牙菜粉末0.3g,其他操作同“2.1.1”项,制备全药材供试品、阴性对照、獐牙菜对照品溶液;精密称取齐墩果酸对照品0.1g,加5mL甲醇溶解,即得齐墩果酸对照品溶液。以乙酸乙酯-甲苯-冰醋酸(4:12:0.5)为展开剂,展开后置于紫外灯(254nm)下观察,结果见图2。由图可知,四者在相同位置均出现相同斑点,阴性无干扰。

2.1.3 毛诃子、余甘子 按“2.1.1”项下方法制备药丸供试品溶液;精密称取毛诃子0.1g、余甘子0.125g,其他操作同“2.1.1”项,制备全药材、阴性对照、毛诃子和余甘子对照品溶

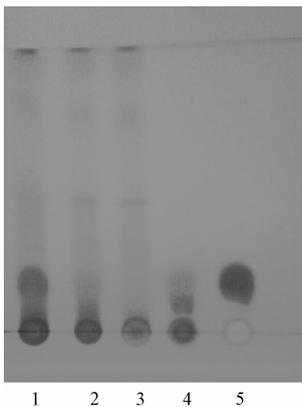


1. 药丸 2. 全药材 3. 阴性对照 4. 獐牙菜 5. 齐墩果酸
1. pills 2. whole medicinal materials 3. negative control
4. *S. bimaculata* 5. oleanolic acid

图2 獐牙菜 TLC 色谱图

Fig.2 TLC chromatogram of *S. bimaculata*

液；精密称取没食子酸对照品 0.007 g，加 0.8 mL 乙醇溶解，即得没食子酸对照品溶液。以乙酸乙酯-三氯甲烷-甲酸（4：6：1）为展开剂，展开后置于紫外灯（254 nm）下观察，结果见图 3。由图可知，四者在相同位置均出现相同斑点，阴性无干扰。



1. 药丸 2. 全药材 3. 阴性对照 4. 毛诃子、余甘子 5. 没食子酸

1. pills 2. whole medicinal materials 3. negative control
4. *T. bellerica* and *P. emblica* 5. gallic acid

图3 毛诃子、余甘子 TLC 色谱图

Fig.3 TLC chromatogram of *T. bellerica* and *P. emblica*

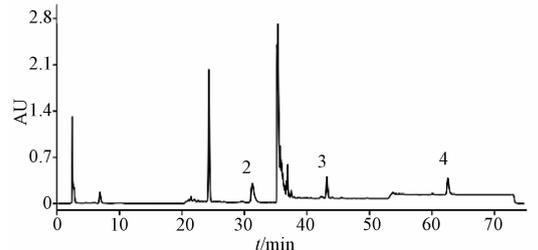
2.2 HPLC 定量测定

2.2.1 色谱条件 sunFire C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 210 nm；柱温 25 ℃；流动相甲醇-0.1% 磷酸，梯度洗脱（程序见表 1）；进样量 20 μL。色谱图见图 4，可知该方法专属性良好。

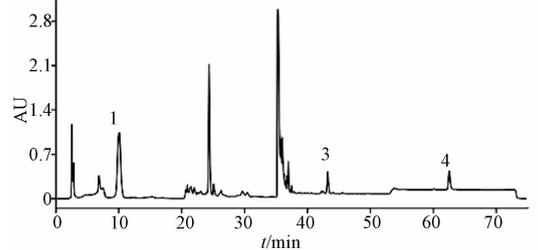
表 1 梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution programs

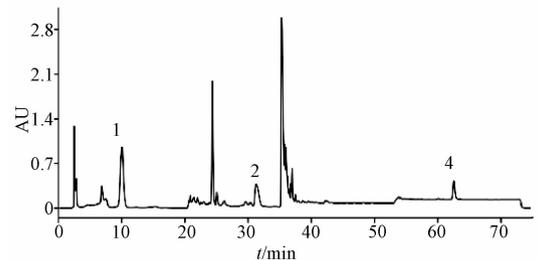
甲醇/%	0.1% 磷酸/%	洗脱时间/min
5	95	17
25	75	15
75	25	18
90	10	20



A. 缺毛诃子、余甘子阴性对照



B. 缺红花阴性对照



C. 缺藏木香阴性对照

1. 没食子酸 2. 羟基红花黄色素 A 3. 土木香内酯 4. 齐墩果酸

1. gallic acid 2. hydroxysafflor yellow A 3. alantolactone 4. oleanolic acid

图4 各成分 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC chromatograms of various constituents

2.2.2 溶液配制

2.2.2.1 对照品贮备液 精密称取土木香内酯、齐墩果酸、没食子酸、羟基红花黄色素 A 对照品适量，置于量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.2.2 供试品溶液 取适量药丸研成细粉，称取 2.54 g，加 25 mL 甲醇溶解，称定质量，加热回流 3 h，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.2.3 阴性对照 参照处方，分别加入除藏木香、獐牙菜、毛诃子及余甘子、红花以外的所有药

材和辅料，按“2.2.2.2”项下方法制备，即得。

2.2.3 线性关系考察 精密量取土木香内酯、齐墩果酸、没食子酸、羟基红花黄色素 A 对照品溶液 (0.216 2、1.611 1、0.203 6、0.213 3 mg/mL) 0.2、0.4、1、2、4 mL 于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，在“2.2.1”项色谱条件下分析。以峰面积为纵坐标 (A)，质量浓度为横坐标 (C) 进行回归，得回归方程分别为 $A = 13.6 \times 10^6 C - 2021.4$ ($r = 0.9999$)、 $A = 4.0 \times 10^6 C - 19937.5$ ($r = 0.9999$)、 $A = 29.6 \times 10^6 C - 9838.7$ ($r = 0.9999$)、 $A = 20.1 \times 10^6 C - 23943.7$ ($r = 0.9999$)，分别在 4.324 ~ 216.2、32.222 ~ 1611.1、4.072 ~ 203.6、4.266 ~ 213.3 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取各对照品溶液 1.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，进样 6 次，测得土木香内酯、齐墩果酸、没食子酸、羟基红花黄色素 A 峰面积 RSD 分别为 0.59%、0.80%、0.55%、0.41%，表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取各对照品溶液 1.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，于 0、1、2、4、8、12、24 h 进样，测得土木香内酯、齐墩果酸、没食子酸、羟基红花黄色素 A 峰面积 RSD 分别为 0.55%、0.66%、0.61%、0.37%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 取同批药丸 6 份，在“2.2.1”项色谱条件下测定，测得土木香内酯、齐墩果酸、没食子酸、羟基红花黄色素 A 峰面积 RSD 分别为 1.42%、0.71%、0.33%、0.84%，表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 取同批药丸 9 份，加入相当于标量 80%、100%、120% 的对照品溶液，按“2.2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下测定，结果见表 2。

2.2.8 样品含有量测定 取“2.2.2.2”项下供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下测定，结果见表 3。

3 讨论

在二十五味肺病丸中，獐牙菜、兔儿草、白花龙胆、无茎芥清热解毒、制疔消炎；肉豆蔻、宽筋藤祛风调隆；石灰华、红花、牛黄等清热、活血行血；诃子、毛诃子、甘草中和诸药，平衡五元和三因；葡萄、力嘎都、沙棘膏等止咳定喘、化痰、温补；檀香、山奈等清肺热、行气^[3]，可见藏木香、獐牙菜、毛诃子和余甘子、红花为主要药材，而且

表 2 各成分加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=9)

成分	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回收	RSD/
	mg	mg	mg	%	率/%	%
土木香内酯	5.40	4.32	9.59	98.6	100.6	0.93
	5.31	4.32	9.66	100.3		
	5.39	4.32	9.78	100.7		
	5.40	5.40	10.75	99.5		
	5.31	5.40	10.89	101.6		
	5.39	5.40	10.83	100.3		
	5.40	6.48	12.10	101.8		
	5.31	6.48	11.90	100.9		
	5.39	6.48	12.03	101.3		
没食子酸	10.99	8.76	19.55	98.9	100.3	2.1
	11.10	8.76	19.56	98.4		
	10.80	8.76	19.30	98.6		
	10.99	10.96	22.11	100.7		
	11.10	10.96	22.61	102.4		
	10.80	10.96	22.10	101.6		
	10.99	13.15	24.60	101.8		
	11.10	13.15	24.60	101.4		
	10.80	13.15	23.80	99.3		
齐墩果酸	15.10	11.20	25.91	98.4	101.5	3.0
	13.31	11.20	24.90	101.6		
	14.91	11.20	26.41	101.4		
	15.10	14.00	30.20	103.7		
	13.31	14.00	28.41	104.0		
	14.91	14.00	29.81	103.1		
	15.10	16.80	32.10	100.6		
	13.31	16.80	30.34	100.3		
	14.91	16.80	31.81	100.3		
羟基红花黄色素 A	13.60	11.04	24.70	100.2	100.1	1.8
	14.21	11.04	25.11	99.4		
	13.63	11.04	23.80	97.4		
	13.60	13.80	27.10	98.9		
	14.21	13.80	27.93	99.6		
	13.63	13.80	28.11	101.8		
	13.60	16.56	30.53	101.2		
	14.21	16.56	30.91	100.4		
	13.63	16.56	30.77	101.8		

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/g)

批号	土木香内酯	齐墩果酸	没食子酸	羟基红花黄色素 A
1	5.34	14.73	10.99	14.06
2	5.33	14.73	10.99	14.08
3	5.34	14.72	11.02	14.09
4	5.38	14.71	10.94	14.11
5	5.39	14.66	10.99	14.11
平均值	5.36	14.71	10.99	14.09

主要活性成分明确。因此，本实验对其进行 TLC 定性鉴定及 HPLC 定量测定。

在 TLC 鉴定时，考察了石油醚-乙酸乙酯-冰醋

酸^[4]、乙酸乙酯-二氯甲烷-甲酸^[5]、丙酮-三氯甲烷-甲酸系统^[6]，发现本实验所用系统效果最优。该方法操作简单、斑点清晰、阴性无干扰，可与现行卫生部药品标准藏药第一册中甘草的 TLC 鉴别方法相结合，能更全面、快速地对二十五味肺病丸质量进行控制。

在 HPLC 测定时，比较了乙腈-水^[7-8]、乙腈-水-磷酸^[9]、甲醇-水^[10-11]、甲醇-水-磷酸、乙腈-水-冰醋酸^[12]等多种体系，发现以甲醇-0.1% 磷酸为流动相洗脱时分离效果最好，而且保留时间短、柱效高。

参考文献：

[1] 张 婧, 李 翔, 廖正根, 等. 高载药量二十五味肺病微丸的制备及其性能考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 5-9.
[2] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准 (藏药): 第 1 册[S]. 1995: 140.
[3] 杜连平, 王金霞, 贺世娟, 等. 藏药二十五味肺病胶囊质量标准研究[J]. 食品与药品, 2014, 16(6): 417-421.

[4] 张兴旺, 文怀秀, 陶燕铎, 等. 藏药秦艽花的质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1649-1650.
[5] 杨 洋, 张 艺, 黄 宇, 等. 民族药质量标准研究现状及思考[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2878-2881.
[6] 陈 佳, 金红宇, 田金改, 等. 民族药质量标准现状概述[J]. 中国药事, 2012, 26(2): 191-193.
[7] 张嫚丽, 霍长虹, 刘 丽, 等. 土木香药材 HPLC 指纹图谱研究及土木香内酯和异土木香内酯测定[J]. 中草药, 2010, 41(9): 1539-1542.
[8] 孙小玲, 何 凡, 宿亚柳. TLCs 法与 HPLC 法测定二至丸中齐墩果酸含量的方法比较[J]. 中国药房, 2015, 26(12): 1696-1697.
[9] 金 欣, 王 锋, 姚 岚, 等. HPLC 测定野老鹤草中没食子酸和鞣花酸总量[J]. 中成药, 2010, 32(7): 1172-1176.
[10] 赵永席, 马国营, 梁 恒. RP-HPLC-ELSD 测定山茱萸中齐墩果酸与熊果酸的含量[J]. 中成药, 2005, 27(11): 1314-1316.
[11] 陈珏蓓, 马文彪, 王月红. HPLC 法测定心舒乐片中丹参酮 II A、羟基红花黄色素 A、苦杏仁苷[J]. 中成药, 2012, 34(3): 490-494.
[12] 姜苗松, 王丽娜, 耿 玮. HPLC 测定谷红注射液中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国现代中药, 2011, 13(9): 26-28.